



Attorney Docket # 3029-

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

FEB 06 2002

TECH CENTER 1600/2900 Patent

Examiner: Not Yet Assigned
Group Art: 1651

In re Application of

Tomohiro TSUJI et al.

Serial No.: 09/992,221

Filed: November 06, 2001

For: Method for Classifying and Counting Nucleated
Bone Marrow Cells

I hereby certify that this correspondence is being
deposited with the United States Postal Service with
sufficient postage as first class mail in an envelope
addressed to: Assistant Commissioner for Patents,
Washington, D.C. 20231, on

January 14, 2002
(Date of Deposit)

Lance J. Lieberman
Name of applicant, inventor, or Registered Representative

Signature

January 14, 2002
Date of Signature

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

LETTER TRANSMITTING PRIORITY DOCUMENT

In order to complete the claim to priority in the above-identified application under
35 U.S.C. §119, enclosed herewith is a certified copy of each foreign application on which the claim
of priority is based: Japan on November 08, 2000, No. 2000-341113.

Respectfully submitted,

COHEN, PONTANI, LIEBERMAN & PAVANE

By

Lance J. Lieberman
Reg. No. 28,437
551 Fifth Avenue, Suite 1210
New York, N.Y. 10176
(212) 687-2770

January 14, 2002



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年11月 8日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-341113

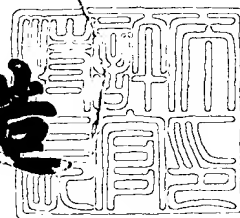
出 願 人
Applicant(s):

シスメックス株式会社

2001年12月14日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3108776

【書類名】 特許願

【整理番号】 00-045JP

【あて先】 特許庁長官殿

【提出日】 平成12年11月 8日

【国際特許分類】 G01N 33/48

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 辻 智悠

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 森 悠丞

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 坂田 孝

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 浜口 行雄

【特許出願人】

 【識別番号】 390014960

 【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088867

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西野 卓嗣

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 059617

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9723350

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨髓有核細胞分類計数方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程からなる骨髓有核細胞分類計数方法；

(1) 赤血球を測定の際の障害とならないように処理し、白血球系細胞と赤芽球系細胞を染色に好適な状態にするための赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、

(2) (1) で調製した試料を少なくとも白血球系細胞と赤芽球系細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも 1 つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、

(3) (2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも 1 つの散乱光と、少なくとも 1 つの蛍光を測定する工程、

(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて骨髓有核細胞を分類計数する工程、

(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を分類計数する工程、

(6) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球系細胞を分類計数する工程、

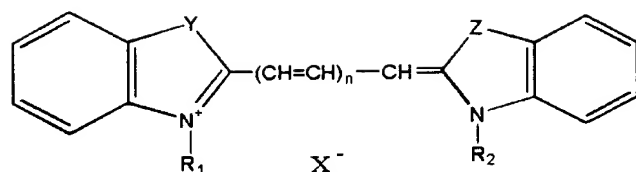
(7) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と (5) で分類計数した赤芽球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程、

(8) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と (6) で分類計数した白血球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する白血球系細胞の割合を算出する工程、

(9) (5) で分類計数した赤芽球系細胞数と (6) で分類計数した白血球系細胞数より、白血球系細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程。

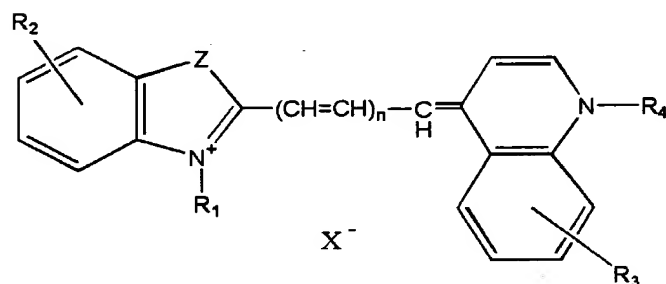
【請求項 2】 蛍光色素が、以下の群から選ばれる請求項 1 記載の骨髓有核細胞分類計数方法。

【化 1】



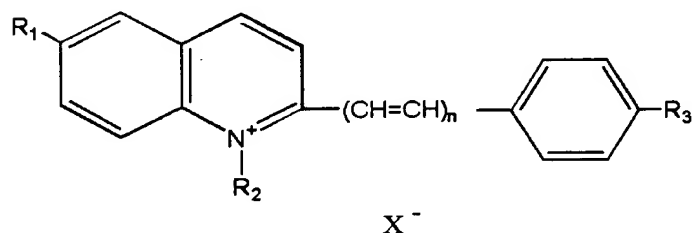
(式中、 R_1 、 R_2 、は水素原子又はアルキル基又はアルキニル基又は水酸基で置換されたアルキル基；Y、Zは硫黄又は酸素又は窒素又は低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2； X^- はアニオンである。)

【化 2】



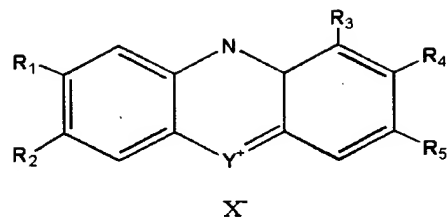
(式中、 R_1 は水素原子又はアルキル基； R_2 および R_3 は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基； R_4 は水素原子、アシル基又はアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2； X^- はアニオンである。)

【化 3】



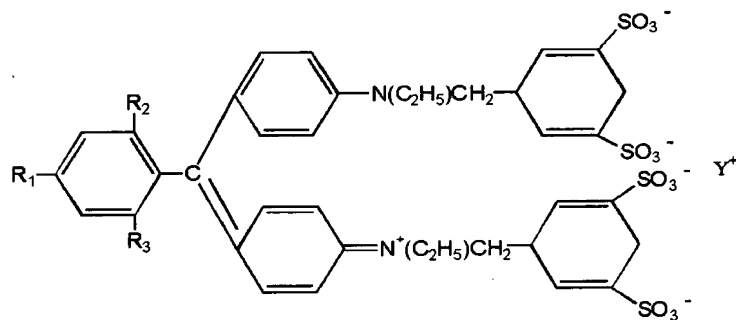
(式中、 R_1 は水素原子又はジメチルアミノ基； R_2 はアルキル基、 R_3 は水素原子又はジメチルアミノ基；nは1又は2； X^- はアニオンである。)

【化 4】



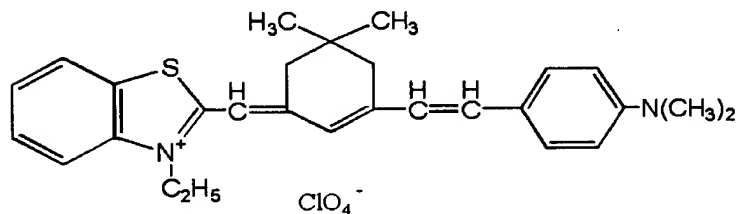
(式中、 R_1 は水素原子又はアルキル基； R_2 はジメチルアミノ基； R_3 は水素原子又はアミノ基； R_4 は水素原子又はアルキル基又はアミノ基； R_5 は水素原子又はジメチルアミノ基； X^- はアニオン； Y は硫黄又は酸素である。)

【化 5】



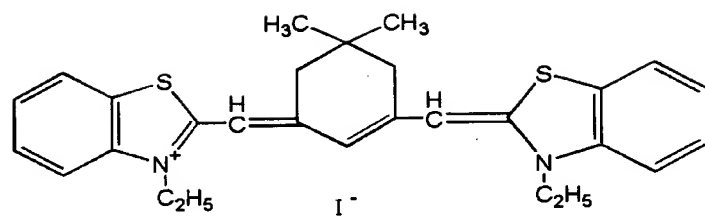
(式中、 R_1 は水素原子又は水酸基； R_2 は水素原子又はスルホン酸基； R_3 は水素原子又はスルホン酸基； Y^+ はアルカリ金属イオンである。)

【化 6】



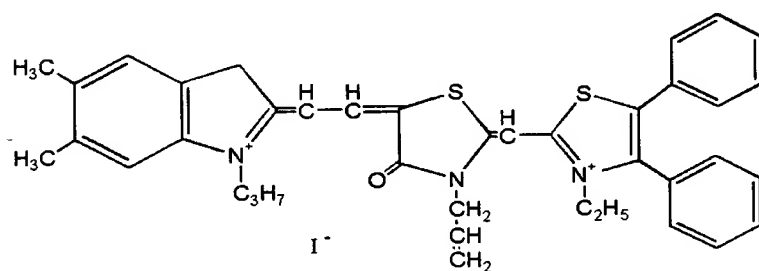
NK-2825

【化 7】



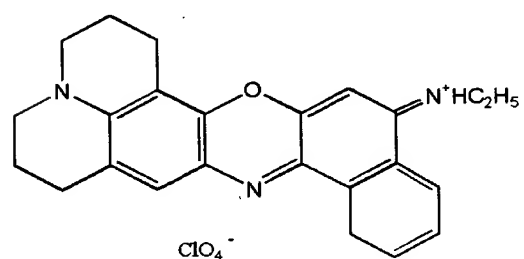
NK-1836

【化 8】



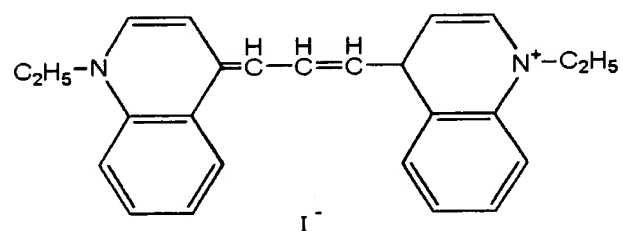
NK-1954

【化 9】



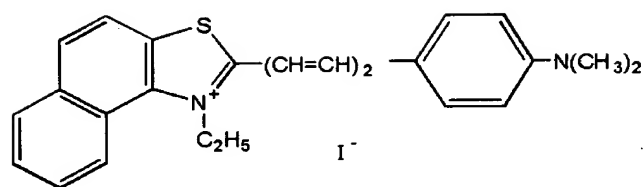
Oxazine750

【化 10】



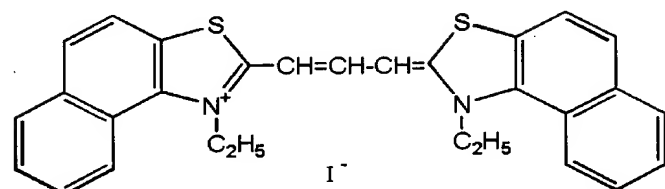
Cryptocyanine

【化 1 1】



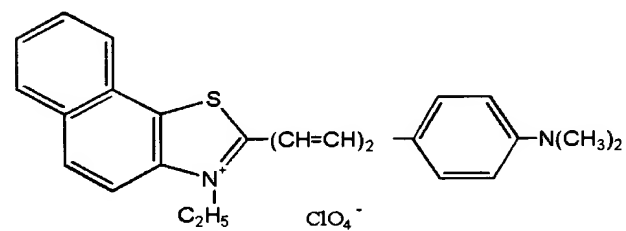
NK-376

【化 1 2】



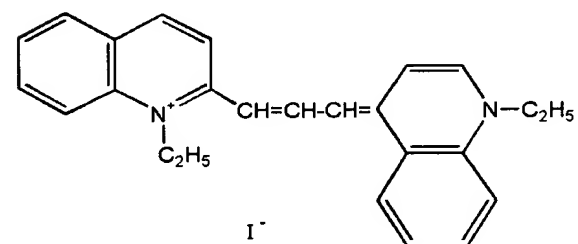
NK-382

【化 1 3】



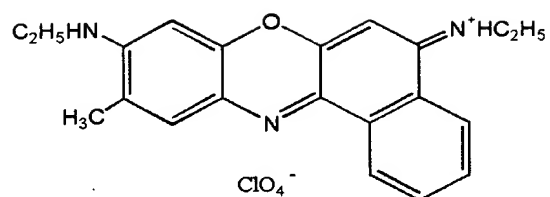
NK-2711

【化 1 4】



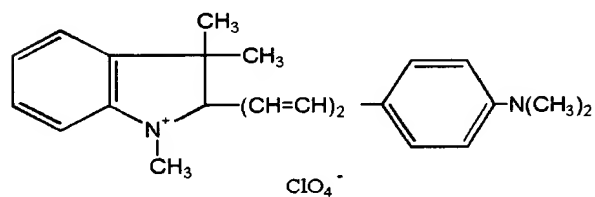
NK-138

【化 1 5】



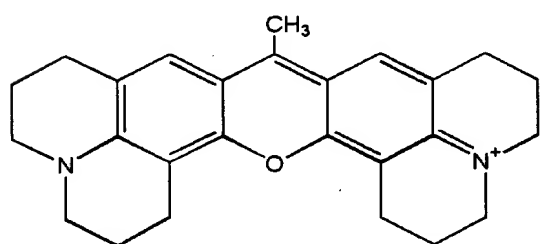
Oxazine720

【化 1 6】



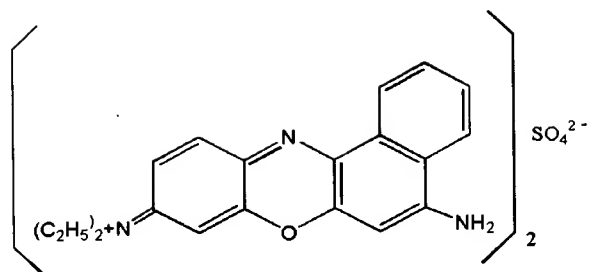
LDS730

【化 1 7】



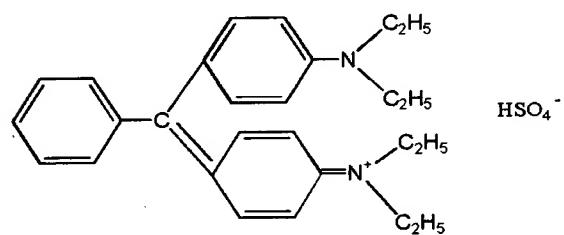
LD700

【化 1 8】



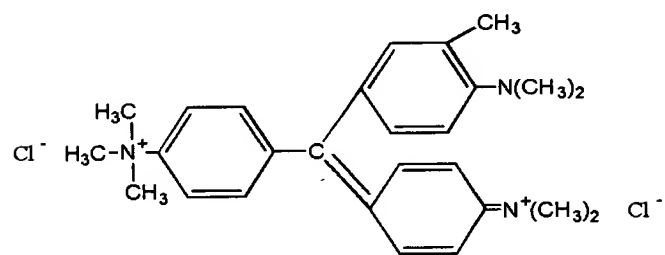
Nile Blue A

【化 1 9】



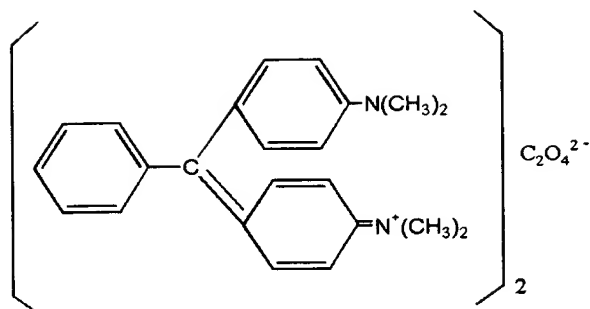
Brilliant Green

【化 2 0】



Iodide green

【化 2 1】

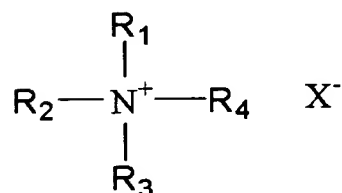


Malachite green

【請求項 3】 赤血球溶解剤が、浸透圧 1 0 0 m O s m / k g 以下の p H 2 . 0 ~ 5 . 0 の水溶液である請求項 1 記載の骨髓有核細胞計数方法。

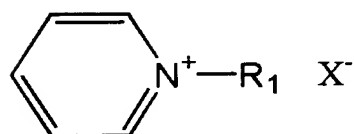
【請求項 4】 界面活性剤が、以下の群から選ばれる請求項 1 記載の骨髓有核細胞分類計数方法。

【化 2 2】



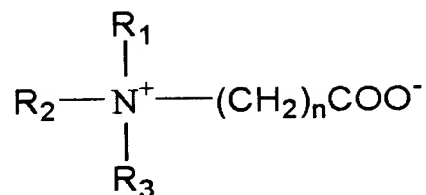
(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-8} アルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基； R_4 は C_{8-18} のアルキル基、 C_{8-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基； X^- はアニオンである。)

【化 2 3】



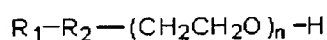
(式中、 R_1 は C_{8-18} のアルキル基； X^- はアニオンである。)

【化 2 4】

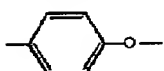


(式中、 R_1 、 R_2 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-8} のアルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基； R_3 は C_{8-18} のアルキル基、 C_{8-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基； n は1又は2である。)

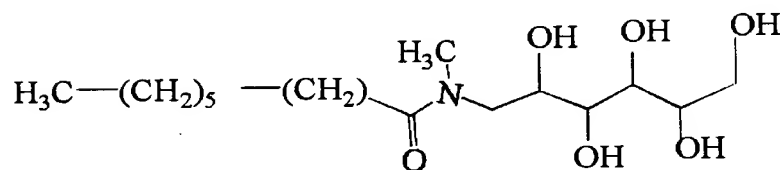
【化 2 5】



(式中、 R_1 は C_{9-25} のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；

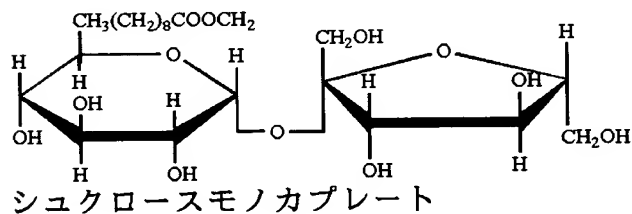
R_2 は  または $-\text{COO}-$ ； n は10～40である。)

【化 2 6】

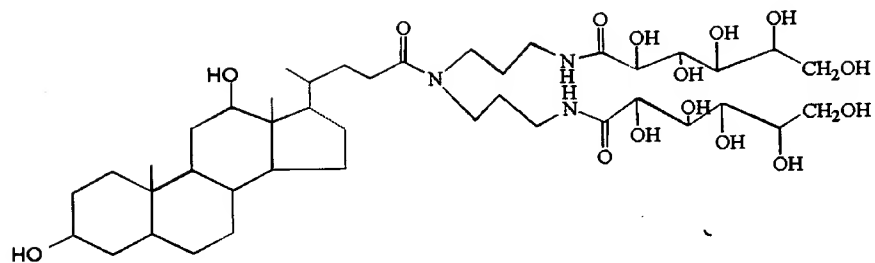


MEGA-8

【化 2 7】

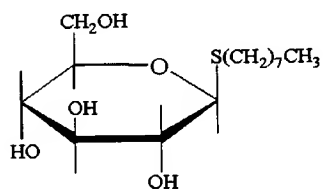


【化 28】



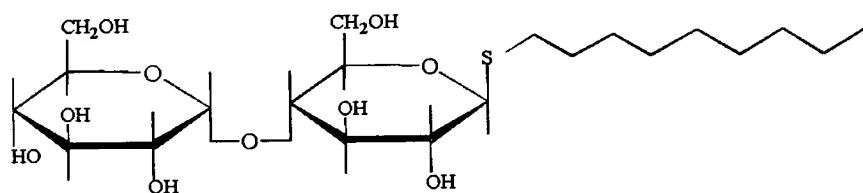
Deoxy-BIGCHAP

【化 29】



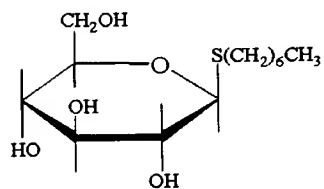
n-オクチル-β-D-チオグルコシド

【化 30】



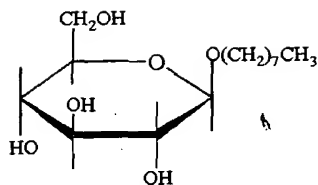
n-ノニル-β-D-チオマルトシド

【化 31】



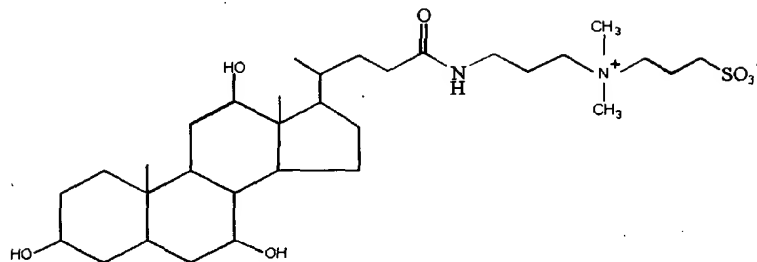
n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド

【化 3 2】



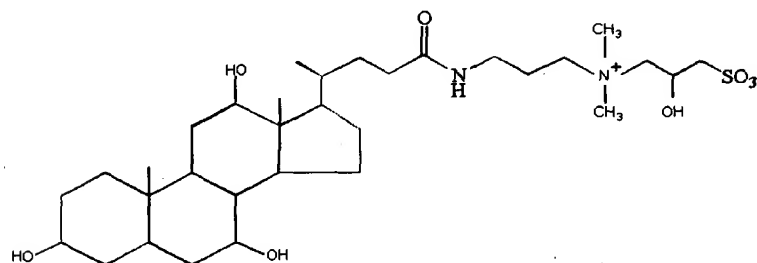
n-オクチル-β-D-チオグルコシド

【化 3 3】



CHAPS

【化 3 4】



CHAPSO

【請求項 5】 界面活性剤濃度が 10～10000 mg/l である請求項 1 記載の骨髓有核細胞計数方法。

【請求項 6】 以下の工程からなる骨髓有核細胞分類計数方法；

(1) 赤血球を測定の障害とならないように処理し、白血球系細胞と赤芽球系細胞を染色に好適な状態にするための赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、

(2) (1) で調製した試料を少なくとも白血球系細胞と赤芽球系細胞の間に蛍

光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、

(3) (2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、

(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて骨髓有核細胞を分類計数する工程、

(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を分類計数する工程、

(6) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球系細胞を分類計数する工程、

(7) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と(5)で分類計数した赤芽球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程、

(8) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と(6)で分類計数した白血球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する白血球系細胞の割合を算出する工程、

(9) (5) で分類計数した赤芽球系細胞数と(6)で分類した白血球系細胞数より、白血球系細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程、

(10) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数する工程、

(11) (5) で分類計数した赤芽球系細胞数と、(10)で成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数した全赤芽球系細胞に対する各成熟度の赤芽球の割合を算出する工程、

(12) (6) で分類計数した白血球細胞数から、リンパ球数と単球数を引算することにより、骨髓系細胞数を求める工程、

(13) (12) で求めた骨髓系細胞数と(5)で求めた赤芽球系細胞数より、骨髓系細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程

【請求項7】 測定する散乱光が、前方低角散乱光、前方高角散乱光及び側方散乱光から選ばれる少なくとも1つである請求項1～6記載の骨髓有核細胞分類計数方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明はフローサイトメトリによる骨髓有核細胞の分類計数に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

臨床検査の分野において、骨髓有核細胞の分類計数を行うことは、疾患の診断を行う上で極めて有用な情報を得ることができる。例えば、通常、正常な骨髓では白血球系細胞、赤芽球系細胞などの有核細胞が一定の比率で存在する。疾患が原因となり、有核細胞数、赤芽球系細胞数、白血球系細胞数は変化し、結果として白血球系細胞と赤芽球系細胞の比率は変動する。例えば、有核細胞数が増加する疾患として、各種急性白血病、骨髓異形成症候群（MDS）、慢性骨髓性白血病（CML）などが挙げられ、有核細胞数が減少する疾患として、再生不良性貧血や低形成性白血病などが挙げられる。また白血球系細胞数が増加する疾患として、各種白血病や悪性リンパ腫の白血化などが挙げられ、赤芽球系細胞数が低下するものとしては、赤芽球癆などが挙げられる。また多くの貧血は赤芽球系細胞が増加する。このように骨髓有核細胞や骨髓中の白血球系細胞、赤芽球系細胞を分類計数し、細胞比を求めることは、疾患同定、造血器細胞産生能などを調べる上で極めて有用である。

【0 0 0 3】

従来、骨髓分類計数を行うには、骨髓の塗沫標本を作製し、適当な染色を施した後に顕微鏡で観察しながら分類計数するのが一般的であった。一方、近年、フローサイトメータの原理を応用した種々の全自動血球分類計数装置が提供されている。しかしながら、これらの装置は、骨髓液に含まれる脂質成分が測定障害となったり、血球細胞が凝集しやすいなどの問題があり、骨髓有核細胞を分類計数することはできなかった。

【0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、高精度で骨髓有核細胞を分類計数する方法を提供することを目的と

する。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の工程：

- (1) 赤血球を測定の障害とならないように処理し、白血球系細胞と赤芽球系細胞を染色に好適な状態にするための赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、
 - (2) (1) で調製した試料を少なくとも白血球系細胞と赤芽球系細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、
 - (3) (2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、
 - (4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて骨髓有核細胞を分類計数する工程、
 - (5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を分類計数する工程、
 - (6) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球系細胞を分類計数する工程、
 - (7) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と(5)で分類計数した赤芽球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程、
 - (8) (4) で分類計数した骨髓有核細胞数と(6)で分類計数した白血球系細胞数より、骨髓有核細胞に対する白血球系細胞の割合を算出する工程、
 - (9) (5) で分類計数した赤芽球系細胞数と(6)で分類した白血球系細胞数より、白血球系細胞に対する赤芽球系細胞の割合を算出する工程
- からなる骨髓有核細胞分類計数方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の形態】

本発明でいう骨髓液は、骨髓穿刺液、希釈した骨髓穿刺液など、白血球系細胞、赤芽球系細胞を含む試料をいう。

【 0 0 0 7 】

本発明でいう、白血球系細胞並びに赤芽球系細胞を染色に好適な状態にする溶解剤と界面活性剤からなる溶血剤と混合し、赤血球を測定の障害とならない程度に溶解する。このために好適な溶解剤とは、赤血球を溶解するが、白血球系細胞、赤芽球系細胞へのダメージの少ない溶解剤であり、例えば、浸透圧 100 mOsm/kg 以下、 $\text{pH } 2.0 \sim 5.0$ の水溶液である。

【 0 0 0 8 】

本工程の目的は、赤芽球系細胞と白血球系細胞を測定する上で障害となる赤血球を溶血すること、赤芽球系細胞と白血球系細胞の間に蛍光強度の差異を生じさせることである。

【 0 0 0 9 】

本発明では、骨髓液の前処理は特に必要としないが、脂質成分、血球細胞凝集などにより、測定に障害が発生するようであれば、必要に応じて、フィルタレーション、キレート剤及び緩衝剤を含む溶液での希釈、または界面活性剤による処理などを行っても良い。

【 0 0 1 0 】

赤血球は、若干の個体差があるが、通常 150 mOsm/kg 以下の浸透圧で細胞膜に細孔を生じ、細胞内部のヘモグロビンを流出し、光学的に透明となる（溶血する）。光学的に透明となった赤血球は、測定の障害とはならなくなる。赤血球の溶血は浸透圧の低いほど、 pH の低いほど速やかに進行する。本発明で使用する溶血剤では、個体差考慮して 100 mOsm/kg 以下の浸透圧を使用する。この浸透圧を達成するためには、例えば、 NaCl 、 KCl などの電解質、糖類又は後述の緩衝剤濃度などにより浸透圧を調整することができる。 pH が低すぎる場合、赤血球のみならず、白血球系細胞、赤芽球系細胞にも過度の障害を与えるため、後述する蛍光強度の差異が得にくくなる。

【 0 0 1 1 】

溶血の pH は、赤血球の溶血が効率よく行われるために、酸性側にすることが好適である。特に好適には、 $2.0 \sim 5.0$ の pH が使用される。さらに好適には $2.5 \sim 4.5$ の pH が選ばれる。

【0 0 1 2】

また、pHを一定に保つためには、緩衝剤を使用することが好適であり、設定するpH±2.0の付近にpKaを有する緩衝剤が使用できる。例えば、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、ジグリコール酸、マロン酸などの緩衝剤を含むことができる。

【0 0 1 3】

さらに、溶血剤中に少なくとも1つの、分子内に少なくとも1つの芳香環を有する有機酸もしくはその塩を使用することにより、より効果的に（短時間に）赤血球を溶血することができる。好ましい有機酸もしくはその塩としては、例えばサリチル酸、サリチル酸ナトリウム、フタル酸などが挙げられる。これらは、緩衝剤としても作用する。

【0 0 1 4】

本条件下では、赤芽球系細胞の細胞膜も赤血球と同様に細孔を生じ溶血するが、赤芽球系細胞の細胞核の性状は、ほぼ生きた細胞と同様に保たれる。

【0 0 1 5】

一方、白血球系細胞の細胞膜への傷害は明確ではないが、光学的顕微鏡による観察では、生細胞と顕著な差は認められない。

【0 0 1 6】

本発明では、赤血球溶解剤を含む水溶液にさらに界面活性剤を含むが、界面活性剤は、骨髓液中の脂質成分の可溶化、難溶性の色素の可溶化、赤血球ゴーストの凝集防止、血小板凝集防止、赤血球ゴースト収縮、赤血球溶血促進の目的で使

【0 0 1 7】

しかし、界面活性剤の濃度が高すぎる場合、赤血球のみならず、白血球系細胞、赤芽球系細胞にも過度の傷害を与え、特に赤芽球系細胞の形状を変化させ、後述する赤芽球系細胞と白血球系細胞の蛍光強度の差異を小さくする問題がある。

【0 0 1 8】

従って、本発明に使用する界面活性剤は、赤芽球系細胞と白血球系細胞の蛍光強度の差異を小さくしないように濃度の調整を行った。

【 0 0 1 9 】

界面活性剤濃度は、10～10000mg/lにすることが好適である。さらに好適には、100～5000mg/lの濃度が選ばれる。

【 0 0 2 0 】

この結果、予期せぬことに、従来不可能であると考えられてきた、赤芽球系細胞と白血球系細胞の間の明瞭な蛍光強度の差異を生じさせ、骨髓有核細胞、赤芽球系細胞、白血球系細胞を分類計数でき、加えて赤芽球系細胞を成熟度ごとに分類計数することが可能になった。

【 0 0 2 1 】

また求めた骨髓有核細胞数、赤芽球系細胞数、白血球系細胞数から、骨髓有核細胞に対する赤芽球系細胞の比率、骨髓有核細胞に対する白血球系細胞の比率、白血球系細胞に対する赤芽球系細胞の比率を求めることができる。加えて、血球計数器からリンパ球数、単球数を求めることにより、骨髓系細胞数と骨髓細胞に対する赤芽球系細胞の比率（M/E比）を求めることが可能である。

【 0 0 2 2 】

白血球系細胞に対する赤芽球系細胞の比率は、通常2～5であり、骨髓系細胞に対する赤芽球系細胞の比は、1.5～3.3である。白血病などの疾患により、これらの比率は変化する。また、これらの比率は、急性骨髓性白血病（AML）や骨髓異形成症候群（MDS）の診断・病型分類に有用である。したがって、経日的に測定することにより、各種白血病の病態把握、治療効果のモニタリングなどが可能である。

【 0 0 2 3 】

また骨髓有核細胞中の赤芽球系細胞数、あるいは全赤芽球系細胞に対する各成熟段階の赤芽球の割合を求めると、骨髓中のエリスロポエシスの状態を把握することもできる。通常、最も成熟した分画であるStage IIIが全赤芽球の大部分を占めるが、エリスロポエチンなどのサイトカインの投与等で、エリスロポエシスが亢進すると、幼若な赤芽球分画であるStage II, Stage Iの比率が増加する。また、化学療法等でエリスロポエシスが低下すると、Stage II, Stage Iの比率が低下する。各成熟段階の赤芽球を分類計数することにより、各種病態・

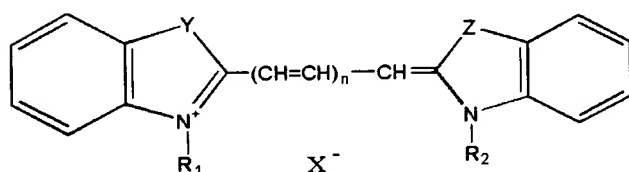
治療効果のモニタリングが可能となる。

【 0 0 2 4 】

少なくとも白血球系細胞と赤芽球系細胞の間に蛍光強度の差異を生じる蛍光色素とは、以下の群からなる色素のうち少なくとも１種類が使用される。

【 0 0 2 5 】

【化 3 5】

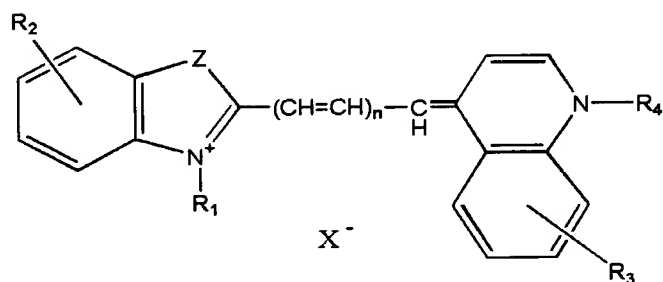


【 0 0 2 6 】

(式中、 R_1 、 R_2 、は水素原子又はアルキル基又はアルキニル基又は水酸基で置換されたアルキル基； Y 、 Z は硫黄又は酸素又は窒素又は低級アルキル基を有する炭素； n は0、1又は2； X^- はアニオンである。)

【 0 0 2 7 】

【化 3 6】

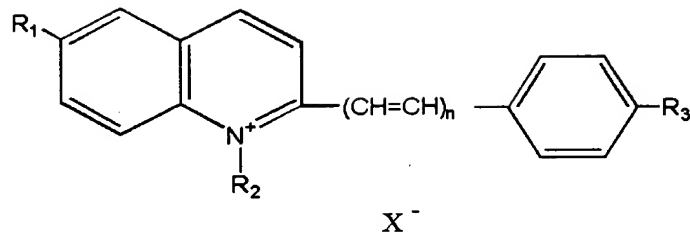


【 0 0 2 8 】

(式中、 R_1 は水素原子又はアルキル基； R_2 および R_3 は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基； R_4 は水素原子、アシル基又はアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは低級アルキル基を有する炭素；nは0，1又は2； X^- はアニオンである。)

【 0 0 2 9 】

【化 37】

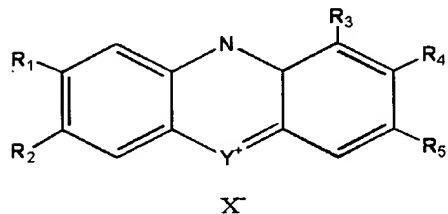


【0030】

(式中、 R_1 は水素原子又はジメチルアミノ基； R_2 はアルキル基、 R_3 は水素原子又はジメチルアミノ基； n は1又は2； X^{-} はアニオンである。)

【0031】

【化 38】

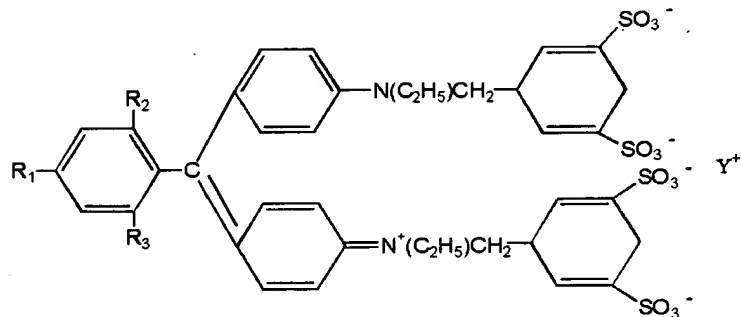


【0032】

(式中、 R_1 は水素原子又はアルキル基； R_2 はジメチルアミノ基； R_3 は水素原子又はアミノ基； R_4 は水素原子又はアルキル基又はアミノ基； R_5 は水素原子又はジメチルアミノ基； X^{-} はアニオン； Y は硫黄又は酸素である。)

【0033】

【化 39】

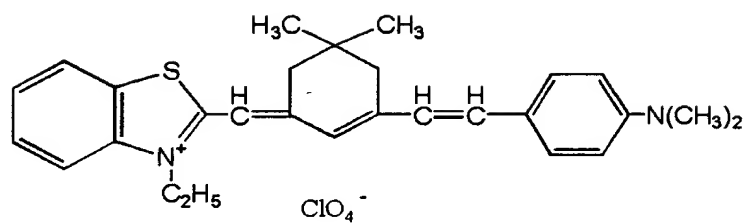


【0034】

(式中、 R_1 は水素原子又は水酸基； R_2 は水素原子又はスルホン酸基； R_3 は水素原子又はスルホン酸基； Y^{+} はアルカリ金属イオンである。)

【0035】

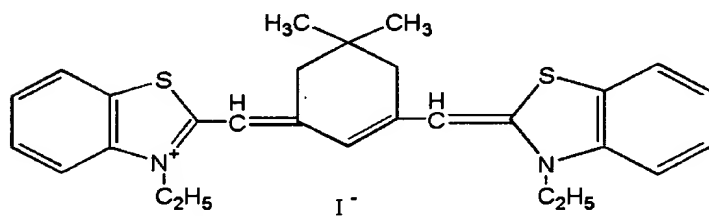
【化40】



NK-2825

【0036】

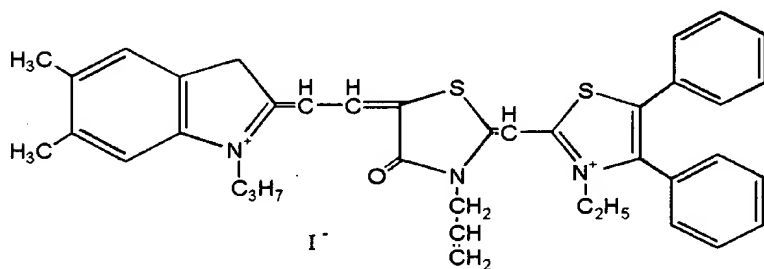
【化41】



NK-1836

【0037】

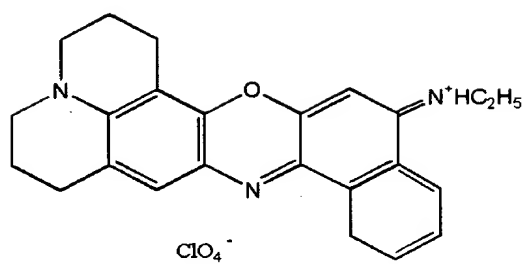
【化42】



NK-1954

【0038】

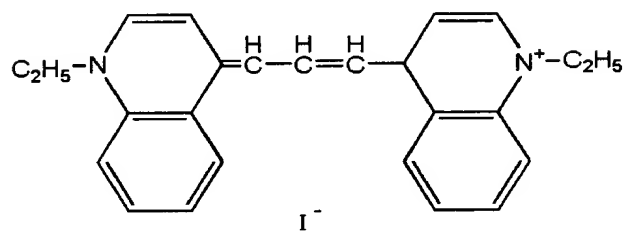
【化 4 3】



Oxazine750

【0 0 3 9】

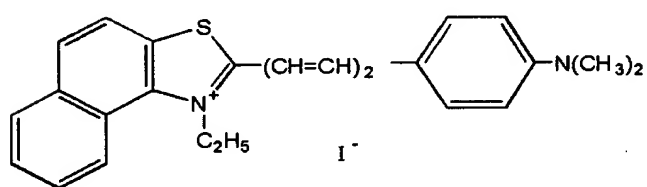
【化 4 4】



Cryptocyanine

【0 0 4 0】

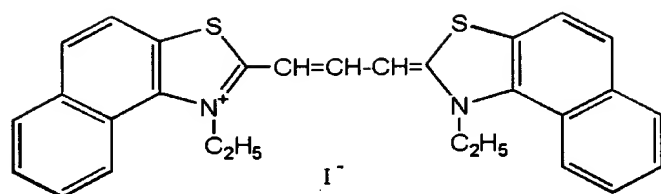
【化 4 5】



NK-376

【0 0 4 1】

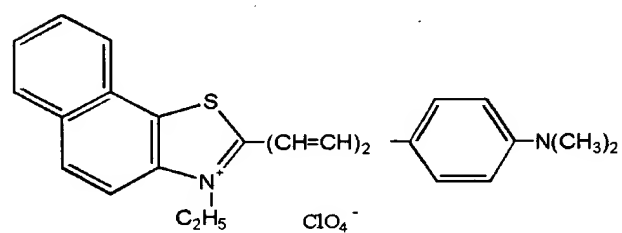
【化 4 6】



NK-382

【 0 0 4 2】

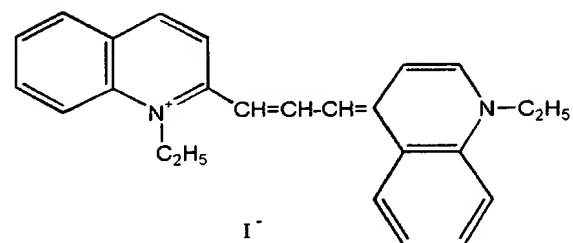
【化 4 7】



NK-2711

【 0 0 4 3】

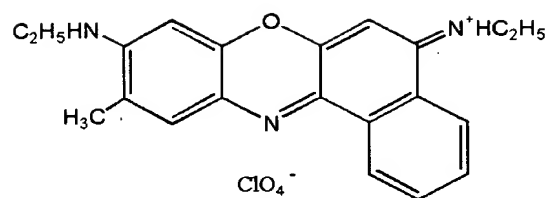
【化 4 8】



NK-138

【 0 0 4 4】

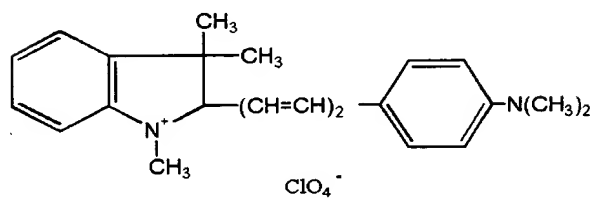
【化 4 9】



Oxazine720

【 0 0 4 5】

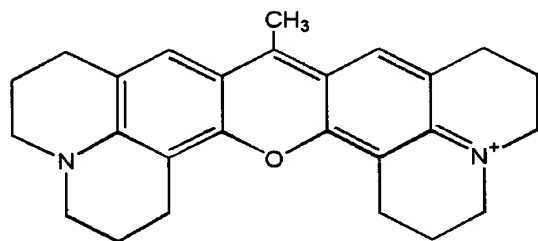
【化 5 0】



LDS730

【 0 0 4 6】

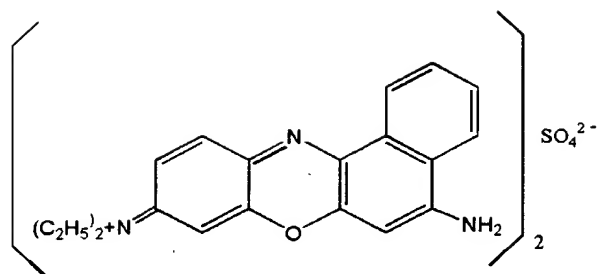
【化 5 1】



LD700

【 0 0 4 7】

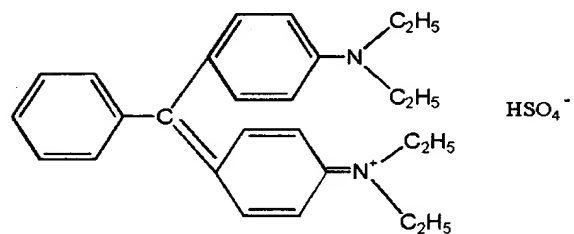
【化 5 2】



Nile Blue A

【0 0 4 8】

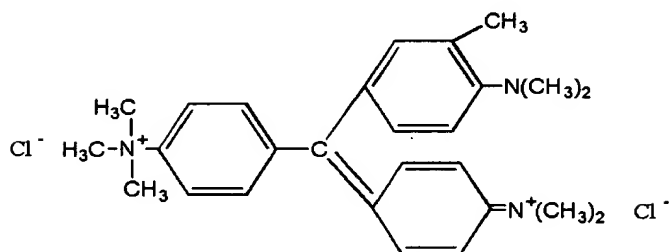
【化 5 3】



Brilliant Green

【0 0 4 9】

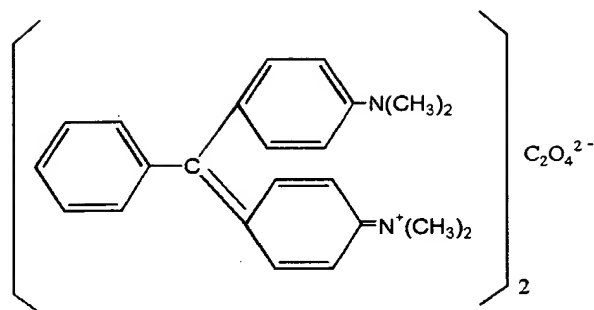
【化 5 4】



Iodide green

【0 0 5 0】

【化 5 5】



Malachite green

【0 0 5 1】

式中、ヘテロ環の窒素原子又は炭素原子に結合するアルキル基は、炭素数 1 - 20、好ましくは、1 - 10、より好ましくは 1 - 6 のアルキル基であり、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを挙げることができる。

【0 0 5 2】

低級アルキル基又は低級アルコキシル基とは炭素数 1 - 8 の直鎖又は分岐アルキル基又はアルコキシル基であり、好ましくはメチル、エチル、メトキシ、エトキシである。アシル基としては炭素数 1 - 3 のもの、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニルが好ましい。好ましいアニオンには、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- などのハロゲンイオン、及び $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 、 ClO_4^- などを含む。

【0 0 5 3】

上記に記載した色素のうち NK シリーズは、日本感光色素研究所（株）より、LDS 730、LD 700 は Exciton 社より、その他のものは市販品を購入することができる。

【0 0 5 4】

蛍光色素は、溶血剤に溶解させ、溶血剤と同時に血液に作用させても（混合させても）良いし、溶解処理（工程の）後、適当な溶媒（水、低級アルコール、エチレングリコール、DMSO、等）に溶解したものを添加しても良い。

【0 0 5 5】

色素の濃度は使用する色素により異なるが、一般に 0.01~100mg/l、好ましくは 0.1~10mg/l、より好ましくは 0.3~3.0mg/l である。なお、この濃度は溶血剤と色素溶液を混合した状態での濃度である。

【0056】

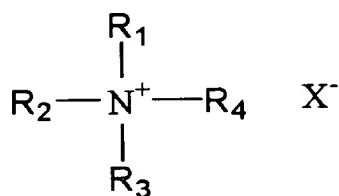
前述の溶血剤で処理した血球を上述の色素で染色した場合、白血球系細胞は強く染色され、フローサイトメータで測定した場合強い蛍光を発する。一方、赤芽球系細胞は弱く染色され、弱い蛍光を発する。白血球系細胞と赤芽球系細胞の蛍光強度に差異が生じる作用機序は明確ではないが、おそらく赤芽球系細胞の核（DNA）が凝縮しているために、色素の細胞核への取り込みが阻害されていると考えられる。

【0057】

本発明で使用される界面活性剤としては、以下の群から少なくとも 1 種類が好適に使用される。

【0058】

【化 5 6】

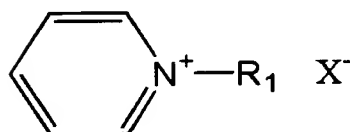


【0059】

（式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-8} のアルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基； R_4 は C_{8-18} のアルキル基、 C_{8-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基； X^- はアニオンである。）

【0060】

【化 5 7】

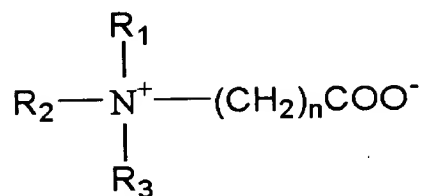


【0061】

(式中、 R_1 は C_{8-18} のアルキル基； X^- はアニオンである。)

【0062】

【化58】

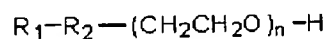


【0063】

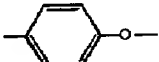
(式中、 R_1 、 R_2 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-8} のアルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基； R_3 は C_{8-18} のアルキル基、 C_{8-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基； n は1又は2である。)

【0064】

【化59】

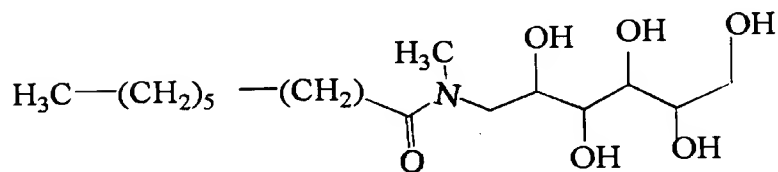


(式中、 R_1 は C_9-25 のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；

R_2 は  または $-COO-$ ； n は10～40である。)

【0065】

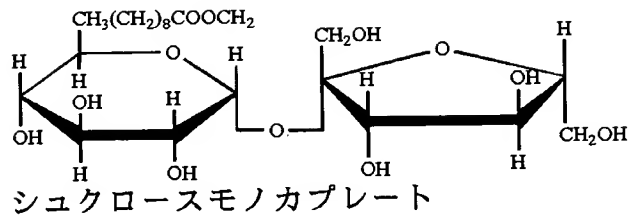
【化60】



MEGA-8

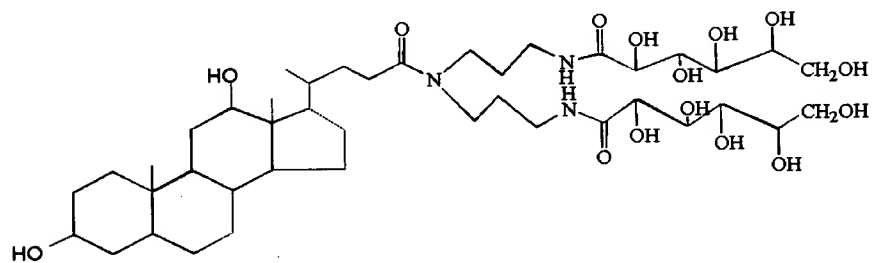
【0066】

【化61】



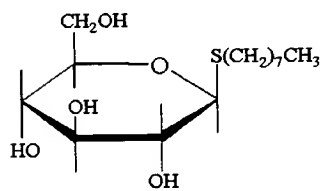
【0067】

【化62】



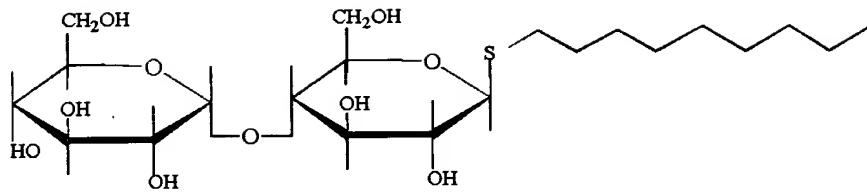
【0068】

【化63】



【0069】

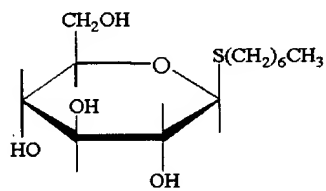
【化 6 4】



n-ノニル-β-D-チオマルトシド

【 0 0 7 0】

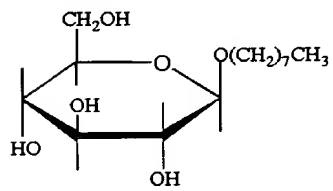
【化 6 5】



n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド

【 0 0 7 1】

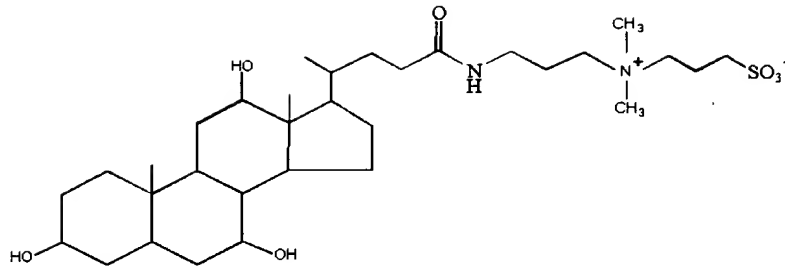
【化 6 6】



n-オクチル-β-D-チオグルコシド

【 0 0 7 2】

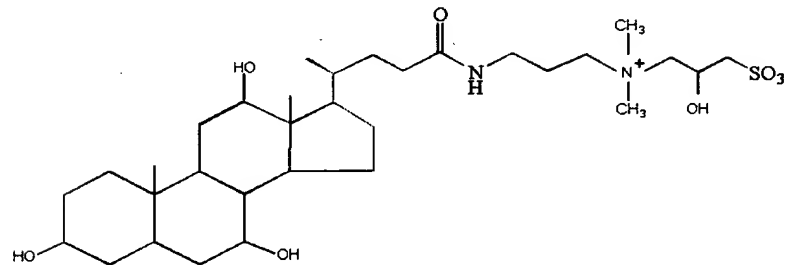
【化 67】



CHAPS

【0073】

【化 68】



CHAPSO

【0074】

上記の式中、 C_{1-8} のアルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ベンジルなどを挙げることができる。好ましくは、メチル、エチルなどの C_{1-3} のアルキル基である。

【0075】

C_{8-18} のアルキル基、 C_{8-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基としては、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、オレイルなどを挙げることができる。好ましくはデシル、ドデシル、テトラデシルなどの C_{10-18} の直鎖のアルキル基である。

【0076】

C_{8-18} のアルキル基としては、デシル、ドデシル、テトラデシルなどの C_{10-18}

₈の直鎖のアルキル基を挙げることができる。

【0077】

また、C₉₋₂₅のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基の例としては、ノニル、ドデシル、ヘキサデシル、オレイル等が挙げられる。

【0078】

上記に記載した界面活性剤のうち、MEGA-8からCHAPSOまでは株式会社 同仁化学研究所より購入することができる。

【0079】

界面活性剤の濃度は、10～10000mg/l、好ましくは100～5000mg/l、さらには好ましくは1000～3000mg/lである。なお、この濃度は溶血剤に含まれる界面活性剤の濃度である。

【0080】

本発明の好ましい態様では、サリチル酸などの有機酸、色素、及び界面活性剤を精製水に溶解し、NaOH、HClなどを用いてpHを調整して得られる簡単な組成の試薬を用いることができる。試薬と試料を混合し、15～50℃、好ましくは20～40℃で、3～120秒間、好ましくは5～40秒間反応させる。

【0081】

このようにして調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する。

【0082】

本発明でいう散乱光は、一般に市販されるフローサイトメータで測定できる散乱光をさし、前方低角散乱光（受光角度の例として、0～5度未満）、前方高角散乱光（受光角度の例として、5～20度付近）、側方散乱光（受光角度は90度付近）等をいい、好ましくは、前方低角散乱光が選ばれ、この散乱光は白血球系細胞の大きさ情報を反映する。

【0083】

蛍光とは、前述の細胞成分と色素から発せられるもので、使用する色素によって好適な受光波長が選択される。蛍光信号は、細胞化学的特性を反映するものである。

【 0 0 8 4 】

フローサイトメータの光源は、特に限定されず、色素の励起に好適な波長の光源が選ばれる。例えば、アルゴンイオンレーザ、He-Neレーザ、赤色半導体レーザなどが使用される。特に半導体レーザは気体レーザに比べ非常に安価であり、装置コストを大幅に下げることができる。

【 0 0 8 5 】

次いで、測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて骨髓有核細胞、赤芽球系細胞、白血球系細胞を分類計数する。「測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて骨髓有核細胞を分類計数する工程」とは、(1) 例えば、X軸に蛍光、Y軸に前方低角散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、骨髓有核細胞及びゴースト化した細胞の各細胞は、集団(クラスター)を形成して分布する；そして(2) この集団を、適当な解析ソフトを用いて、集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞数を解析することにより、骨髓有核細胞の数を計算する、工程をいう。「測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を分類計数する工程」とは、(1) 例えば、X軸に蛍光、Y軸に前方散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、赤芽球系細胞、白血球系細胞、及びゴースト化した細胞の各細胞は、集団(クラスター)を形成して分布する；そして(2) この集団を、適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞数を解析することにより、赤芽球系細胞の数と割合を計算する、工程をいう。同様に、白血球系細胞の数も計算できる。「赤芽球系細胞を成熟度ごとに分類計数する工程」とは、(1) 例えばX軸に蛍光、Y軸に前方散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、赤芽球系細胞は成熟度によって集団(クラスター)を形成して分布し；そして(2) この集団を、適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域内に含まれる細胞数を解析することにより、赤芽球系細胞の各成熟度での数と割合を算出する工程、をいう。

【 0 0 8 6 】

「白血球細胞数から、リンパ球数と単球数を引算することにより、骨髓系細胞数を求める工程」とは、(1) 例えば、同一の試料を他の血球計数器で測定し、

リンパ球数と単球数を求める；（２）白血球細胞数からリンパ球数と単球数を引くことにより、骨髓系細胞数が計算できる；（３）算出した骨髓系細胞と赤芽球系細胞の比（M／E比）を算出する工程、をいう。

【 0 0 8 7 】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明には種々の変更、修飾が可能であり、従って、本発明の範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

【 0 0 8 8 】

【実施例】

以下の組成の試薬を調製した。

サリチル酸（市販品）	1 0 m M
N K - 2 8 2 5 （日本感光色素研究所（株））	0 . 3 m g / l
ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド（市販品）	0 . 3 g / l
精製水	1 l
N a O H で p H を 3 . 0 に調整（浸透圧 4 0 m O s m / k g ）	

まず、上記試薬 1 . 0 m l を急性骨髓性白血病（A M L）患者の骨髓液を 3 0 μ l に加え、4 0 ℃で 5 秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は 6 3 3 n m の赤色半導体レーザを使用した。蛍光は 6 6 0 n m 以上の波長の蛍光を測定した。

【 0 0 8 9 】

図 2 に X 軸に赤蛍光強度、Y 軸に前方低角散乱光強度をとったスキヤッタグラムを示す。骨髓有核細胞は、白血球系細胞、赤芽球系細胞 Stage I、赤芽球系細胞 Stage II、赤芽球系細胞 Stage III の 4 つの集団を形成する。

【 0 0 9 0 】

上記の骨髓にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球系細胞、赤芽球系細胞を分類し、さらに赤芽球系細胞を前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球に分類した。また血球計数器より得たリンパ球数と単球数から、骨髓系細胞数を算出し、骨髓系細胞に対する赤芽球系

細胞の比を算出し、上記フローサイトメータで得られた結果と比較した。

【 0 0 9 1 】

図 3 にフローサイトメータで得られた結果と目視の結果を示す。

【 0 0 9 2 】

図 3 より、本発明と目視の結果がよく一致していることが判明した。

【発明の効果】

本発明によれば、高精度で骨髓有核細胞を分類計数することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の方法によって得られるスキャッタグラムの模式図である。

【図 2】

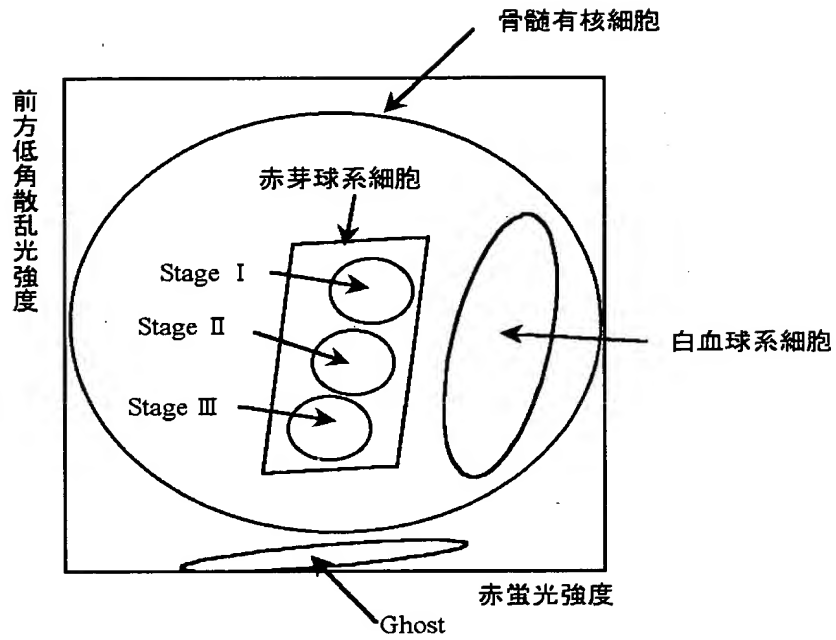
本発明の実施例によって得られるスキャッタグラムである。

【図 3】

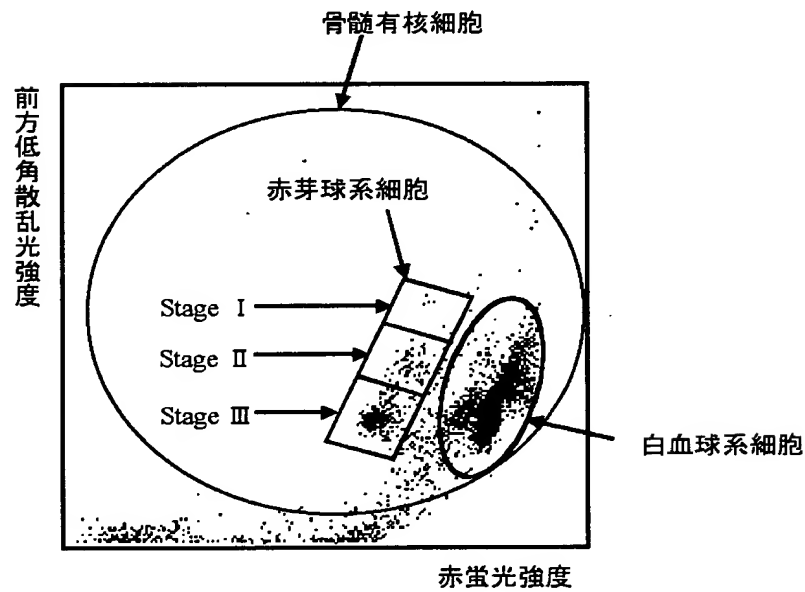
本発明と目視の結果を比較した図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【図 3】

	本発明	目視法
有核細胞数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1149	975
白血球系細胞数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1035	870
赤芽球系細胞数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	114	105
有核細胞数/白血球系細胞比	1.11:1	1.12:1
有核細胞数/赤芽球系細胞比	10.1:1	9.29:1
白血球系細胞/赤芽球系細胞比	9.1:1	8.29:1
骨髓系細胞/赤芽球系細胞比 (M/E 比)	6.4:1	7.0:1
赤芽球系 Stage I	0.5%	0%
赤芽球系 Stage II	17.8%	18%
赤芽球系 Stage III	81.7%	82%

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高精度で骨髓有核細胞を分類計数する方法を提供する。

【解決手段】 赤血球を測定の障害とならないように処理し、少なくとも白血球系細胞と赤芽球系細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色し、調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定して骨髓有核細胞、赤芽球系細胞及び白血球系細胞を分類計数する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日

[変更理由] 名称変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

氏 名 シスメックス株式会社